

Kovalente Lipid-Phosphonocarbonsäure-Konjugate, deren Herstellung sowie deren Verwendung als antivirale Arzneimittel

Publication number: DE19547022 (A1)

Publication date: 1997-06-19

Inventor(s): HERRMANN DIETER DR [DE]; OPITZ HANS-GEORG DR [DE]; ZILCH HARALD DIPL CHEM DR [DE]; VOSS EDGAR DIPL CHEM DR [DE]; ZIMMERMANN GERD DIPL CHEM DR [DE]

Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE]

Classification:

- International: A61K31/00; A61K31/66; A61K31/662; A61P31/00; A61P31/12; C07F9/40; A61K31/00; A61K31/66; A61K31/662; A61P31/00; C07F9/00; (IPC1-7): C07F9/40; A61K31/66

- European: C07F9/40A1; C07F9/40A9Q

Application number: DE19951047022 19951215

Priority number(s): DE19951047022 19951215

Also published as:

ZA9610511 (A)

US5955452 (A)

TW409128 (B)

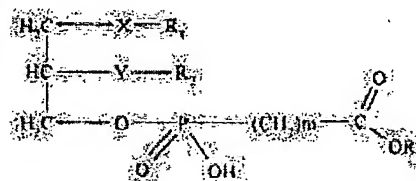
TR9801083 (T2)

SK75598 (A3)

more >>

Abstract of DE 19547022 (A1)

The present invention relates to: novel lipid derivatives of phosphono-carboxylic acids of general formula (I), the symbols of which are explained in the description; the tautomers and their physiologically acceptable salts of inorganic and organic bases; as well as methods of producing said derivatives and medicaments containing them.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 47 022 A 1

⑥ Int. Cl.®:
C 07 F 9/40
A 61 K 31/86

②① Aktenzeichen: 195 47 022.2
②② Anmeldetag: 15. 12. 95
②③ Offenlegungstag: 19. 8. 97

DE 195 47 022 A 1

⑦① Anmelder:

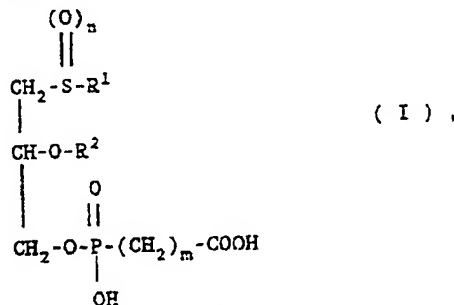
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:

Herrmann, Dieter, Dr., 69126 Heidelberg, DE; Opitz, Hans-Georg, Dr., 69469 Weinheim, DE; Zilch, Harald, Dipl.-Chem. Dr., 68305 Mannheim, DE; Voss, Edgar, Dipl.-Chem. Dr., 68519 Viernheim, DE; Zimmermann, Gerd, Dipl.-Chem. Dr., 68309 Mannheim, DE

⑤④ Kovalente Lipid-Phosphonocarbonsäure-Konjugate, deren Herstellung sowie deren Verwendung als antivirale Arzneimittel

⑤⑤ Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue Lipid-Derivate von Phosphonocarbonsäuren der allgemeinen Formel I,



bei der die Bedeutung der Symbole in der Beschreibung erklärt ist, deren Tautomere und deren physiologisch verträgliche Salze anorganischer und organischer Basen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneimittel.

DE 195 47 022 A 1

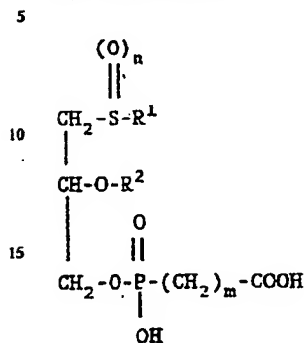
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04. 97 702 025/359

12/23

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue Phospholipid-Derivate von Phosphonocarbonsäuren der allgemeinen Formel I,



in der
 R^1 eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 9–13 Kohlenstoffatomen,
 R^2 eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 8–12 Kohlenstoffatomen sein kann,

n 0, 1 oder 2 bedeutet und

m 0 bzw. für 1 bis 3 steht,

deren Tautomere und deren physiologisch verträgliche Salze anorganischer und organischer Basen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneimittel.

Da die Verbindungen der allgemeinen Formel I asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten, sind auch sämtliche optisch aktiven Formen und racemische Gemische dieser Verbindungen Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Therapie bösartiger Neoplasien (Karzinome, Sarkome, hämatologische Neoplasien), entzündlicher Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen sowie von durch Viren oder Retroviren hervorgerufenen Erkrankungen, wie beispielsweise von AIDS, ARC (AIDS related complex), Cytomegalie-, Herpes-Infektionen oder Hepatitis, ist neben der unzureichenden Wirksamkeit der eingesetzten therapeutischen Wirkstoffe häufig auch mit deren extremen Nebenwirkungen verbunden. Dieser Effekt ist mit der zu geringen In-vivo-Selektivität bzw. der eingeschränkten therapeutischen Breite der eingesetzten pharmakologisch aktiven Substanzen zu erklären. Die günstigen pharmakologischen In-vitro-Eigenschaften der pharmakologisch aktiven Substanzen sind oft nicht auf die In-vivo-Verhältnisse übertragbar.

Seit Jahren versucht man deshalb durch Modifizierung der chemischen Struktur von pharmakologisch aktiven Substanzen neue Substanzen zur Verfügung zu stellen die verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der therapeutischen Breite aufweisen. Ferner werden oft neue pharmazeutische Darreichungsformen mit dem Ziel entwickelt, die aktiven Substanzen gezielt an ihren Wirkungsort zu transportieren, an dem sie ihre therapeutische Wirkung entfalten sollen. Dabei soll insbesondere die unerwünschte Wechselwirkung mit gesunden Zellen vermieden werden. Im Falle von Tumorzellen, die entsprechende Oberflächenantigene besitzen, wurden beispielsweise Antikörper hergestellt, die diese speziellen Oberflächenantigene erkennen und somit gezielt an die Krebszelle binden. Die Antikörper sind mit geeigneten Toxinen derart modifiziert, daß nach erfolgter Bindung an die Krebszelle das Toxin freigesetzt und die Krebszelle getötet wird. Eine andere Alternative zur Verbesserung der therapeutischen Breite besteht darin, durch geringfügige Modifizierung der pharmakologisch aktiven Substanz, beispielsweise durch Herstellung von Säure- oder Basenadditionssalzen oder durch Herstellung von einfachen Estern [beispielsweise Fettsäureester; J. Pharm. Sci. 79, 531 (1990)], die physikalischen Eigenschaften der zugrundeliegenden aktiven Substanz derart zu verändern, daß die Löslichkeit oder Verträglichkeit der aktiven Substanz verbessert wird. Diese geringfügig chemisch modifizierten Verbindungen werden oft auch als "Prodrugs" bezeichnet, da sie beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten oder in der Leber (first pass-Metabolismus) nahezu unmittelbar in das therapeutisch aktive Agens umgewandelt werden.

Zur Verbesserung der katabolischen Stabilität wurden Nucleoside, wie z. B. ara-C und ara-A chemisch an Phospholipide gebunden. Die entsprechenden Derivate zeigten geringere Toxizität und höhere Stabilität in vivo im Vergleich zu den unmodifizierten Nucleosiden. Absorption und Zellpenetration zeigten sich aber kaum beeinflusst [J. Med. Chem. 32 367 (1989), Cancer Res. 37 1640 (1977) und 41 2707 (1981)]. Weitere Phospholipid-Derivate von Nucleosiden kennt man beispielsweise aus folgenden Literaturstellen:

In J. Biol. Chem. 265, 6112 (1990) ist die Herstellung und Verwendung von Liponucleotiden als antivirale Arzneimittel beschrieben. Untersucht und synthetisiert wurden hier aber nur die an bekannte Nucleoside, wie z. B. AZT und ddC, gekoppelten Dimyristoylphosphatidyl- und Dipalmitoylphosphatidylreste mit ihrer Fettsäureesterstruktur.

In J. Med. Chem. 33 1380 (1990) sind Nucleosid-Konjugate von Thioetherlipiden mit Cytidindiphosphat beschrieben, die eine antitumorale Wirkung aufweisen und Verwendung in der Onkologie finden könnten.

In Chem. Pharm. Bull. 36 209 (1988) sind 5'-(3-SN-Phosphatidyl)-nucleoside mit antileukämischer Aktivität beschrieben sowie deren enzymatische Synthese aus den entsprechenden Nucleosiden und Phosphocholinen in

Gegenwart von Phospholipase D mit Transferaseaktivität.

Die enzymatische Synthese von Liponucleotiden ist u. a. ebenfalls in Tetrahedron Lett. 28,199 (1987) und Chem. Pharm. Bull 36 5020 (1988) beschrieben.

In WO 94/13324 sind oral verfügbare Wirkstoffe mit 1-O-Alkyl-, 1-O-Acyl-, 1-S-Acyl- und 1-S-Alkyl-sn-glycero-3-phosphaten als Lipid-Carrier beschrieben.

Die Anmeldung EP 418814 sowie J. Med. Chem. 34 1912 (1991) beschreiben Isoprenoidphosphinylformiate als Squalen-Synthetase-Inhibitoren.

In Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 458 (1990) ist mit Palmitylphosphonoformiat ein Lipid-Konjugat des antiretroviralen Foscarnets beschrieben und in J. Med. Chem. 20 660 (1977) wird die Anti-HIV-Aktivität von (Hexyloxy)-hydroxyphosphinylsäure aufgezeigt.

Es ist allgemein sehr hilfreich, effektive Wege zu finden therapeutische Arzneimittel-Konzentrationen in die entsprechenden Zielorgane bzw. Zielzellen zu transportieren, bei AIDS z. B. in die Zellen des Immunsystems und des lymphatischen Systems, die als Hauptreservoir der Virusreplikation gelten.

PFA (Phosphonoformicacid) und PAA (Phosphonoaceticacid) zeigen gute antivirale Aktivität gegen HSV 1 und 2, Influenza, HBV, VZV, EBV sowie retrovirale Infektionen.

PFNPAA und ihre Derivate stellen unter Umständen eine effektive Alternative/Ergänzung zu Nucleosiden dar, da sie ein breites Spektrum von DNA- und RNA-Polymerasen sowie die RT von Retroviren mit hinreichender Selektivität hemmen.

PFA und PAA selbst zeigen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Pyrophosphat eine Toxizität durch Akkumulation im Knochen.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung weisen ebenfalls wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf. Insbesondere eignen sie sich zur Therapie und Prophylaxe von Infektionen, die durch DNA-Viren wie z. B. das Herpes-Simplex-Virus, das Zytomegalie-Virus, Papova-Viren, das Varicella-Zoster-Virus, die Hepatitis-Viren oder Epstein-Barr-Virus oder RNA-Viren wie Toga-Viren oder insbesondere Retroviren wie die Onko-Viren HTLV-I und II, sowie die Lentiviren Visna und Humänes-Immunschwäche-Virus HIV-1 und -2, verursacht werden.

Besonders geeignet erscheinen die Verbindungen der Formel I zur Behandlung der klinischen Manifestationen der retroviralen HIV-Infektion beim Menschen, wie der anhaltenden generalisierten Lymphadenopathie (PGL), dem fortgeschrittenen Stadium des AIDS-verwandten Komplex (ARC) und dem klinischen Vollbild von AIDS.

Für Foscarnet (Phosphonoameisensäure-trinatriumsalz/PFA) ist in J. Infect. Dis. 172, 225 (1995) der antivirale/antiretrovirale Effekt in HIV-Patienten mit CMV-Retinitis beschrieben.

Der antivirale Effekt in murinem CMV ist in Antiviral Res. 26,1(1995) beschrieben.

Weiterhin wird in JAMA 273,1457 (1995) PFA zur Behandlung von CMV-Retinitis genutzt.

PFA- und PAA-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin-Konjugate, die eine Inhibierung der HIV-1-Replikation zeigen, sind in J. Med. Chem. 37 2216 (1994) dargestellt und in J. Pharm. Sci. 83 1269 (1994) sind Acyloxyalkylester von Foscarnet beschrieben.

Von besonderem Interesse sind jedoch die US-Anmeldung 5, 194, 654 bzw. die PCT-Anmeldung WO 94/13682. Hierin sind Lipid-Derivate von Phosphonocarbonsäuren beschrieben und deren Verwendung in Liposomen unter Bildung eines besonders stabilen liposomalen Komplexes. Neben einem äußerst breiten und sehr spekulativen Anspruch sind als Kern der Anmeldung 1-O-Alkyl-sn-glycero-3-phosphonocarbonsäuren beschrieben, die besonders gut in die Lipiddoppelschicht von Liposomen eingebaut werden. Die beanspruchten Alkylreste können 2—24 Kohlenstoffatome umfassen.

Als Beispiel beschrieben und mit Daten für eine antivirale Wirkung belegt ist nur die Verbindung 1-O-Octadecyl-sn-glycero-3-phosphonoformiat (Batyl-Phosphonoformiat).

Diese Verbindung hat sich bei den Untersuchungen und bei der Herstellung als nicht stabil herausgestellt. Im Gegensatz zu den genannten Patentanmeldungen werden die Verbindung als Reinsubstanz in Lösung/Suspension verwendet, nicht in Liposomen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I sind unter den gleichen Bedingungen stabil und zeigen sowohl in vitro als auch in vivo (MCMV-Modell in der Maus) eindeutige Vorteile.

Überraschenderweise wurde eine sehr enge Strukturwirkungsbeziehung bezüglich der Kettenlänge der verwendeten gesättigten Alkylreste festgestellt. Nur die Verwendung von zwei Alkylresten im Kettenlängenbereich von 10—12-Kohlenstoffatomen zeigen optimale Effekte.

Die beanspruchten Verbindungen dieser Anmeldung stellen daher einen Auswahleffekt aus WO 94/13682 und US 5, 194, 654 dar, wobei sie von diesen Anmeldungen zwar umfaßt sind, jedoch nicht den Kern der Anmeldung darstellen und auch nicht explizit genannt bzw. namentlich erwähnt sind.

Die Verbindungen der Formel I sind deshalb neu. Neben der besseren Stabilität (in Substanz und in Lösung) der beanspruchten Verbindungen zeigen diese auch eine bessere Wirkung im Vergleich zu den bekannten Lipid-Derivaten.

Überraschenderweise besitzen die pharmazeutischen Wirkstoffe der Formel I im Vergleich zu den pharmakologisch aktiven freien bzw. unmodifizierten Substanzen eine größere therapeutische Breite. Sie verbessern darüber hinaus deren Verweilzeit im Körper, die Bioverfügbarkeit oder die oft als kritischer Faktor bekannte Membrangängigkeit (z. B. Blut-Hirn-Schranke, Zellmembran, etc.) der pharmakologisch aktiven Substanzen. Verbindungen der Formel I dienen somit als Trägersystem (Carrier) für die pharmakologisch aktiven Substanzen. Die Konjugate der Formel I können hinsichtlich ihrer Funktion als intrazelluläres Drug-Storage-, Drug-Targeting- und Drug-Delivery-System bezeichnet werden. Sie bewirken, daß die pharmakologisch aktive Substanz nach oraler Applikation intrazellulär freigesetzt wird, wobei diese Freisetzung in vorteilhafter Weise nicht unspezifisch in allen Zellen, Organen oder Geweben des Körpers stattfindet, sondern gezielt in solchen Zellen,

die ein bestimmtes Enzym enthalten. Besonders überraschend ist jedoch, daß die Spaltung nicht bereits schon während des Transportes des Substrates durch die Körperflüssigkeiten, wie z. B. Blut, Serum oder Lympfflüssigkeit oder durch die Leber, erfolgt, sondern erst an oder in den entsprechenden Zielzellen. Auf diese Weise wird das unerwünschte Ausscheiden der Phosphonocarbonsäure durch die Niere oder Spaltung des Konjugats in der Leber vermieden, so daß der weitaus größte Teil des Wirkstoffes an bzw. in die jeweiligen Zielzellen transportiert wird. Derartige Zellen sind, wie oben bereits erwähnt, insbesondere physiologisch oder pathophysiologisch aktivierte Zellen, die als Zielobjekt für die Verabreichung von pharmakologisch aktiven Substanzen in Frage kommen, wie beispielsweise Blutleukozyten, Lymphozyten, Makrophagen und andere Zellpopulationen des immunologisch lymphatischen Systems. Insbesondere handelt es sich hierbei um aktivierte Zellen (z. B. Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Monozyten etc.), die beim jeweiligen Krankheitsgeschehen eine pathophysiologische oder symptomatische Rolle spielen. Darüber hinaus handelt es sich auch um Zellen, die durch Viren, Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen infiziert sind.

Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß die therapeutische Breite einer pharmakologisch aktiven Phosphonocarbonsäure signifikant verbessert wird, wenn die Substanz an ein sehr spezielles lipidartiges Trägermolekül gekoppelt wird. Das so hergestellte Konjugat dient als neuer Wirkstoff für die Herstellung von pharmazeutischen Darreichungsformen. Insgesamt resultiert aus der Kopplung eine verstärkte Wirkung der pharmazeutisch aktiven Phosphonocarbonsäure in vivo, da durch das entstehende Drug-Delivery-Transport-System eine Lokalisierung der pharmakologisch aktiven Substanz in Zielzellen erfolgt und dadurch die pharmakologisch aktive Substanz hinsichtlich ihrer Effizienz und Verträglichkeit verbessert wird. Dies bedeutet, daß einerseits die Menge der zu verabreichenden pharmakologisch aktiven Phosphonocarbonsäure reduziert werden kann oder andererseits unter Beibehaltung der gleichen effektiven Menge eine verstärkte pharmakologische Wirkung erzielt wird.

Aus dem Konjugat wird die pharmakologisch aktive Phosphonocarbonsäure durch enzymatische Hydrolyse des Konjugats freigesetzt.

Die Konjugate der Formel I zeigen entscheidende Vorteile im Vergleich zur nicht konjugierten pharmakologisch aktiven Phosphonocarbonsäure. Der spezifische, kovalent an die pharmakologisch aktive Substanz gebundene Carrier verbessert die Bioverfügbarkeit der schlecht resorbierten pharmakologisch aktiven Substanzen, die Verträglichkeit der potentiell toxischen Wirkmoleküle, die Verweilzeit der schnell eliminierten oder metabolisierten Arzneimitteln und die Membranpenetration der schlecht membrangängigen Verbindungen (z. B. Blut-Hirn, Zellen etc.).

Die enzymatische Spaltung in vivo erfolgt in der Regel nicht im Serum sondern erst intrazellulär. Außerdem verbessert der Carrierteil mit seiner lecithinartigen Struktur, die für den beanspruchten Effekt essentiell ist, die Penetration oder Membrangängigkeit der pharmakologisch aktiven Substanz und zeigt einen Depoteffekt. Darüber hinaus ist die gastrointestinale Verträglichkeit der Lipidkonjugate vielfach besser als die der reinen pharmakologisch aktiven Phosphonocarbonsäure. Auch bei der Resorption zeigt das Lipid-Konjugat eine bessere Penetration durch Membranstrukturen und somit eine bessere Überwindung der Resorptionsbarrieren. Entsprechendes gilt für die Penetration z. B. der Blut-Hirn-Schranke.

Durch eine bessere Bindung des Konjugats an Plasma- und Gewebeproteine wird ferner die Verteilung in vivo verbessert. Durch normale Biotransformation wird das Konjugat primär vom Thioether ($X = S$) zum Sulfoxid ($X = SO$) oxidiert, was aber aufgrund der equipotenten Wirkung des Sulfoxids im Vergleich zum Thioether keinen Nachteil darstellt. Durch eine langsame Freisetzung der pharmakologisch aktiven Phosphonocarbonsäure aus dem Konjugat wird ein niedriger, aber über einen längeren Zeitraum konstanter aktiver Substanzspiegel gewährleistet und somit die Wirkung verbessert und/oder toxische Nebeneffekte vermieden. Die freigesetzte pharmakologisch aktive Substanz in Form des Monophosphats penetriert wegen seiner großen Hydrophilie nicht mehr aus der Zelle heraus.

Sowohl die Gesamtkörper-, Zell- als auch die Organ-Halbwertszeiten der pharmakologisch aktiven Substanz werden durch Konjugation aufgrund der längeren Verweilzeit des Konjugats im Organismus erheblich verlängert. Aufgrund der fehlenden Spaltungsaktivität im Serum und in verschiedenen Organen ist nahezu keine bzw. nur eine sehr geringere Knochenmark- und Organtoxizität zu beobachten. Insbesondere ist vorteilhaft, daß die Konjugate der Formel I in verschiedenen Zielorganen, Geweben oder Zellen spezifisch angereichert werden.

Die Verbindung der Formel I können als Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden, die für alle Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen hohe pharmakologisch aktive Substanzspiegel in Zellen, Organen oder Geweben erforderlich oder hilfreich sind. Eine wesentliche Voraussetzung für dieses als "Drug-Storage-Delivery-Targeting" zu bezeichnende System ist, daß die im Sinne der beabsichtigten Therapie anzusprechenden Zellen das Spaltungsenzym haben so daß in einem ersten Schritt der Wirkstoff bindet und anschließend über die Zellmembran hinweg in das Innere der Zelle transportiert wird, wobei die Spaltung des Wirkstoffes zu der physiologisch aktiven Phosphonocarbonsäure entweder im wesentlichen gleichzeitig mit dem Transport über die Zellmembran oder auch später teilweise innerhalb der Zelle erfolgt. Die intrazelluläre Spaltung kommt insbesondere in solchen Fällen vor, bei denen das Spaltungsenzym auch innerhalb der Zelle lokalisiert ist.

Geeignete Zielzellen sind beispielsweise Zellen des immunologisch-lymphatischen Systems (z. B. Blutleukozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten) oder infizierte Zellen.

Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß Verbindungen der allgemeinen Formel I die Vermehrung von DNA- bzw. RNA-Viren auf der Stufe der virusspezifischen DNA- bzw. RNA-Transkription hemmen. Die Substanzen können über die Inhibierung des Enzyms Reverse Transkriptase die Vermehrung von Retroviren beeinflussen (vgl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 1911, 1986 bzw. Nature 325, 773, 1987). Von besonderem therapeutischen Interesse ist die Hemmwirkung auf das HI-Virus, dem Verursacher der Immunschwäche-Erkrankung AIDS. Zur Behandlung von AIDS ist heute u. a. 3'-Azido-3'-desoxythymidin (DE-A-36 08 606) bei AIDS Patienten zugelassen. Jedoch machen toxische Nebenwirkungen des 3'-Azido-3'-desoxythymidins auf das

Knochenmark bei etwa 50% der behandelten Patienten Bluttransfusionen erforderlich. Die Verbindungen der allgemeinen Formel I besitzen diese Nachteile nicht. Sie wirken antiviral, ohne in pharmakologisch relevanten Dosen zytotoxisch zu sein.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung und ihre pharmazeutischen Zubereitungen können auch in Kombination mit anderen Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe der oben genannten Infektionen eingesetzt werden. Beispiele dieser weiteren Arzneimittel beinhalten Mittel, die zur Behandlung und Prophylaxe von HIV-Infektionen oder diese Krankheit begleitende Erkrankungen einsetzbar sind wie 3'-Azido-3'-desoxythymidin, 2',3'-Dideoxynucleoside wie z. B. 2',3'-Dideoxycytidin, 2',3'-Dideoxyadenosin und 2',3'-Dideoxyinosin, acyclische Nucleoside (z. B. Acyclovir), nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren, Proteaseinhibitoren wie z. B. Inivirase, Interferone wie z. B. Interferon α , β , γ , Cytokine und Interleukine (z. B. Interleukin 16), Chemokine wie z. B. MIP1 α , MIP1 β , CCL1, renale Ausscheidungs-Inhibitoren wie z. B. Probenicid, Nucleosid-Transport-Inhibitoren wie z. B. Dipyridamol, als auch Immunmodulatoren wie z. B. Interleukin II oder Stimulierungs-Faktoren wie z. B. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktoren (GM-CSF), Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktoren (G-CSF, Neutropoetin), Thrombopoetin und thrombopoetin-ähnliche Faktoren. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung und das andere Arzneimittel können jeweils einzeln, gleichzeitig gegebenenfalls in einer einzigen oder zwei getrennten Formulierungen oder zu unterschiedlichen Zeiten verabreicht werden, so daß ein synergistischer Effekt erreicht wird.

Als mögliche Salze der Verbindungen der allgemeinen Formel I kommen vor allem Alkali-, Erdalkali- und Ammoniumsalze der Carboxyl- und Phosphonatgruppe in Frage. Als Alkalisalze sind Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze bevorzugt. Als Erdalkalisalze kommen insbesondere Magnesium- und Calciumsalze in Frage. Unter Ammoniumsalzen werden erfindungsgemäß Salze verstanden, die das Ammoniumion enthalten, das bis zu vierfach durch Alkylreste mit 1-Kohlenstoffatomen und/oder Aralkylreste, bevorzugt Benzylreste, substituiert sein kann. Die Substituenten können hierbei gleich oder verschieden sein.

In der allgemeinen Formel I bedeutet R^1 vorzugsweise eine geradkettige C_{10} – C_{12} -Alkylgruppe. R^1 stellt insbesondere eine Decyl-, Undecyl- oder Dodecylgruppe dar. n ist eine der Zahlen 0,1 oder 2.

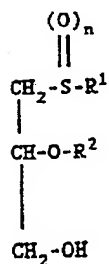
R^2 bedeutet vorzugsweise eine geradkettige C_9 – C_{12} -Alkylgruppe, R^2 stellt insbesondere eine Decyl-, Undecyl- oder Dodecylgruppe dar.

Bevorzugte gekoppelte Phosphonsäuren in den beanspruchten Konjugaten der allgemeinen Formel I sind:

- Phosphonoameisensäure
- Phosphonoessigsäure
- Phosphonopropionsäure

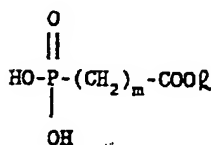
Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können dargestellt werden, in dem man

1. eine Verbindung der allgemeinen Formel II,



(II) ,

in der R^1 , R^2 und n die angegebenen Bedeutungen besitzen, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III,



(III) ,

in der m die oben angegebene Bedeutung besitzt und R einen C_1 – C_6 -Alkylrest darstellt, in Gegenwart von einem gegebenenfalls substituierten Arylsulfonsäurechlorid in einer organischen Base, bzw. in Gegenwart der Base in einem inerten organischen Lösungsmittel umsetzt und anschließend den Carbonsäureester durch alkalische Verseifung in ein Derivat der Formel I bzw. dessen physiologisch verträgliches Salz überführt; oder

2. ein gemischtes Anhydrid aus einer Verbindung der Formel III und einem Alkyl- oder Arylsulfonsäurechlorid

rid herstellt und in Gegenwart einer Base in einem inerten organischen Lösungsmittel bzw. direkt in der Base mit einem Alkohol der Formel II zur Reaktion bringt und anschließend den Carbonsäureester alkalisch verseift; oder

3. eine Phosphonocarbonsäure der Formel III, in der R gleich Wasserstoff ist, mit einem Alkohol der Formel II in Gegenwart einer Base und eines gegebenenfalls substituierten Arylsulfonsäurechlorids umsetzt und nach Bedarf in ein physiologisch verträgliches Salz überführt; oder

4. ein gemischtes Anhydrid aus einer Verbindung der Formel III, in der R gleich Wasserstoff ist, und einem Alkyl- oder Arylsulfonsäurechlorid in Gegenwart einer Base, evtl. in einem inerten organischen Lösungsmittel, mit einem Alkohol der Formel II zur Reaktion bringt und das Konjugat gegebenenfalls in ein physiologisch verträgliches Salz überführt.

oder
5. eine Verbindung der Formel III, in der R einen C_1-C_6 -Alkylrest darstellt, mit Oxalylchlorid, wie in Tetrahedron Letters Vol. 33, No. 49, pp. 7473-7474 beschrieben, in das entsprechende Phosphonsäuredichlorid überführt, das anschließend mit einem Alkohol der Formel II in Gegenwart einer Base im Molverhältnis 1 : 1 umgesetzt wird. Das als Zwischenprodukt entstehende Phosphonsäure-mono-chlorid wird zum Halbester verseift und der Carbonsäureester durch alkalische Verseifung in ein Derivat der Formel I bzw. dessen physiologisch verträgliches Salz überführt.

Phosphonsäuredichloride, die sich von der Struktur III ableiten lassen, sind auch nach Bhongle et al. (Synthetic Commun. 17,1071(1987)) ausgehend von einem Trialkylester durch Überführung in einen Phosphonsäure-bis(trimethylsilyl)ester und anschließende Umsetzung mit Oxalylchlorid zugänglich.

Verbindungen der Formel II und deren Herstellung sind beschrieben in EP-0545699.

Die Arzneimittel enthaltend Verbindungen der Formel I zur Behandlung von z. B. viralen Infektionen können in flüssiger oder fester Form enteral oder parenteral appliziert werden. Hierbei kommen die üblichen Applikationsformen in Frage, wie beispielsweise Tabletten, Kapseln, Dinger, Sirupe, Lösungen oder Suspensionen. Als Injektionsmedium kommt vorzugsweise Wasser zur Anwendung, das die bei Injektionslösungen üblichen Zusätze wie Stabilisierungsmittel, Lösungsvermittler und Puffer enthält. Derartige Zusätze sind z. B. Tartrat- und Zitratpuffer, Ethanol, Komplexbildner, wie Ethylen-diamintetraessigsäure und deren nicht toxischen Salze, hochmolekulare Polymere, wie flüssiges Polyethylenoxid zur Viskositätsregulierung. Flüssige Trägerstoffe für Injektionslösungen müssen steril sein und werden vorzugsweise in Ampullen abgefüllt. Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Stärke, Lactose, Mannit, Methylcellulose, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, höher molekulare Fettsäuren, wie Stearinsäure, Gelatine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, feste hochmolekulare Polymere, wie Polyethylenglykole, etc. Für orale Applikationen geeignete Zubereitungen können gewünschtenfalls Geschmacks- und Süßstoffe enthalten.

Die Dosierung kann von verschiedenen Faktoren, wie Applikationsweise, Spezies, Alter oder individuellem Zustand abhängen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden üblicherweise in Mengen von 0,1-100 mg, vorzugsweise 0,2-80 mg pro Tag und pro kg Körpergewicht appliziert. Bevorzugt ist es, die Tagesdosis auf 2-5 Applikationen zu verteilen, wobei bei jeder Applikation 1-2 Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5-500 mg verabreicht werden. Die Tabletten können auch retardiert sein, wodurch sich die Anzahl der Applikationen pro Tag auf 1-3 vermindert. Der Wirkstoffgehalt der retardierten Tabletten kann 2-1000 mg betragen. Der Wirkstoff kann auch durch Dauerinfusion gegeben werden, wobei die Mengen von 5-5000 mg pro Tag normalerweise ausreichen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen außer den in den Beispielen genannten Verbindungen und der durch Kombination aller in den Ansprüchen genannten Bedeutungen der Substituenten die folgenden Verbindungen der Formel I in Frage:

1. (3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
2. (3-Dodecylsulfinyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
3. (3-Dodecylsulfonyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
4. (3-Undecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
5. (3-Decylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
6. (3-Tridecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
7. (3-Undecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
8. (3-Undecylsulfinyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
9. (3-Undecylsulfonyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
10. (3-Dodecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
11. (3-Decylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
12. (3-Undecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
13. (3-Dodecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
14. (3-Dodecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
15. (3-Undecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
16. (3-Dodecylmercapto-2-octyloxy)propoxy phosphinylameisensäure
17. (3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
18. (3-Dodecylsulfinyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
19. (3-Dodecylsulfonyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
20. (3-Undecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
21. (3-Decylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
22. (3-Tridecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure

23. (3-Undecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
24. (3-Undecylsulfinyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
25. (3-Undecylsulfonyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
26. (3-Dodecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
27. (3-Decylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
28. (3-Undecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
29. (3-Dodecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
30. (3-Dodecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
31. (3-Undecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
32. (3-Dodecylmercapto-2-octyloxy)propoxy phosphinylpropionsäure
33. (3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
34. (3-Dodecylsulfinyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
35. (3-Dodecylsulfonyl-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
36. (3-Undecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
37. (3-Decylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
38. (3-Tridecylmercapto-2-decyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
39. (3-Undecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
40. (3-Undecylsulfinyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
41. (3-Undecylsulfonyl-2-undecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
42. (3-Dodecylmercapto-2-undecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
43. (3-Decylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
44. (3-Undecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
45. (3-Dodecylmercapto-2-dodecyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
46. (3-Dodecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
47. (3-Undecylmercapto-2-nonyloxy)propoxy phosphinylessigsäure
48. (3-Dodecylmercapto-2-octyloxy)propoxy phosphinylessigsäure

Beispiel 1

R,S-(3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propoxy-phosphinylameisensäure Di-Natriumsalz (DMDOP-PFA)

182 ml Phosphonoameisensäure-trimethylester werden in 140 ml Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit 725 ml Brom-trimethylsilan versetzt. Die Mischung wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt eingedampft, der Rückstand zweimal in Methanol aufgenommen und die Lösung jeweils wieder eingedampft. Der Rückstand wird in 30 ml absolutem Pyridin aufgenommen und mit einer Lösung von 48,7 g R,S-(3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propan-1-ol versetzt. Die Mischung wird zur Trockene eingedampft, der Rückstand unter Rühren mit 47,1 g 2,4,6-Tri-isopropyl benzolsulfochlorid und 150 ml abs. Pyridin versetzt. Die anfänglich dicke Suspension wird nach ca. 30 min dünner und wird 25 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der Niederschlag wird abgesaugt und mit etwas Pyridin gewaschen. Das Filtrat wird unter Rühren mit 150 ml Wasser versetzt, die Mischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt, eingedampft und mit Ether versetzt. Der erneut ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und das Etherfiltrat mit 0,5 N HCl ausgeschüttelt. Die Etherphase wird gut mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft.

Der Rückstand (84,2 g) wird durch Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Eisessig (9 : 0,5 : 0,5) gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen werden eingedampft. Man erhält 45,4 g des entsprechenden R,S-(3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propoxy-phosphinylameisensäuremethylesters. DC auf Kieselgel: $R_f = 0,3$ (Essigester/Aceton/Eisessig/Wasser 10 : 4 : 0,5 : 0,5) $R_f = 0,69$ (Dichlormethan/Methanol 8 : 2)

Zur Verseifung des Carbonsäuremethylesters werden 5 g des oben erhaltenen Produktes in 70 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 6,7 ml 2 N NaOH versetzt. Man rührt 4 Stunden und läßt über Nacht stehen. Das Reaktionsgemisch wird mit 2-Ethylhexansäure auf pH 8 abgepuffert und eingedampft. Der Rückstand wird mit Aceton ausgerührt und das ausgefallene Produkt abgesaugt. Man erhält 4,1 g der Titelverbindung vom Fp. 242–246 °C (Zersetzung).

DC auf Kieselgel:

$R_f = 0,31$ (Isopropanol/Butylacetat/Wasser/konz. Ammoniak 10 : 6 : 3 : 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ in D_2O : COOH (δ , 175 ppm, $J_{\text{P-C}} = 231,4$ Hz)

Beispiel 2

R,S-(3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propoxy-phosphinylessigsäure Di-Natriumsalz (DMDOP-PAA)

Analog Beispiel 1 erhält man ausgehend von Phosphonoessigsäure-tri-methylester und (3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propan-1-ol die Titelverbindung vom Fp. 358–360 °C (Zersetzung).

DC auf Kieselgel:

$R_f = 0,53$ (n-Butanol/Eisessig/Wasser 2 : 1 : 1)

$R_f = 0,07$ (Dichlormethan/Eisessig/Wasser 9 : 0,5 : 0,5)

Beispiel 3

Bestimmung der Knochenmarktoxizität in vitro (CFU-GM-Assay) CFU-GM-Assays wurden, wie von Seidel und Kreja (Seidl, H. und J. Kreja, L., Blut 47, 139–145, 1983) beschrieben, durchgeführt. Knochenmarkzellen (1×10^5 Zellen/ml) von Balb/c-Mäusen wurden kultiviert in Iscove-Medium, das 0,8% Methylcellulose, 20% Pferdeserum, 10^{-6} M α -Thioglycerol und ein optimales Volumen (125 oder 25 μ l) Endotoxin-aktivierten Mausserums, das von Balb/c-Mäusen 4 h nach Lv-Injektion von 50 μ g Endotoxin pro Tier (*Salmonella abortus equi*; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) erhalten wurde, enthielt. Nach 6-tägiger Inkubation wurden die Kolonien mit 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl Tetrazoliumchlorid-Hydrat (INT, Sigma) für weitere 24 h gefärbt und dann mit einem automatischen Image-Prozessor (Arteck 982 B, Biosys GmbH, Karben, Deutschland) gezählt.

Tabelle 1 zeigt die IC_{50} -Konzentrationen aus mehreren konzentrationsabhängig durchgeführten Experimenten für Phosphonoameisensäure, DMDOP-PFA, Phosphonoessigsäure, DMDOP-PAA, (3-Octadecyloxy-2-hydroxy)-propoxyphosphinylameisensäureethylester (OOHP-PFAE) und (3-Octadecyloxy-2-hydroxy)propoxyphosphinylameisensäure (OOHP-PFA). Vgl. zu den Zytostatika Cisplatin (Cis-DDP) und Doxorubicin. Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen DMDOP-PFA und DMDOP-PAA bis zur höchsten geprüften Konzentration von 100 μ g/ml keinerlei Toxizität auf Knochenmarkstammzellen der granulozytären/monozytären Reihe. Während dies auch zutrifft für die Phosphonoameisensäure, sind die Phosphonoessigsäure sowie die Konjugate OOHP-PFAE und OOHP-PFA toxischer als DMDOP-PFA und DMDOP-PAA.

Tabelle 1

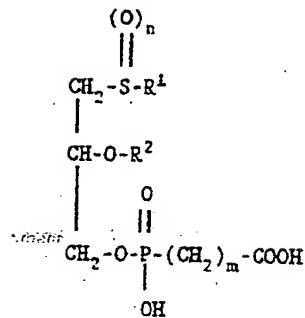
IC_{50} -Werte (μ g/ml) für Cis-DDP, Doxorubicin, Phosphonoameisensäure (Foscarnet), DMDOP-PFA, Phosphonoessigsäure, DMDOP-PAA, OOHP-PFAE und OOHP-PFA im CFU-GM-Assay

Substanz	IC_{50} (μ g/ml) ^a
Cis-DDP (Cisplatin)	0.45 \pm 0.11 (5)
Doxorubicin	0.046 \pm 0.007 (4)
Phosphonoameisensäure (Foscarnet)	> 100 (6)
DMDOP-PFA	> 100 (6)
Phosphonoessigsäure	62.88 (2)
DMDOP-PAA	> 100 (2)
OOHP-PFAE	59.35 (3)
OOHP-PFA	96.49 (3)

a Mittelwert \pm SEM; n, Anzahl der Experimente, die konzentrationsabhängig in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Patentansprüche

1. Neue Phospholipid-Derivate von Phosphonocarbonsäuren der allgemeinen Formel I,



(I) ,

in der

R¹ eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 9—13 KohlenstoffatomenR² eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 8—12 Kohlenstoffatomen sein kann,

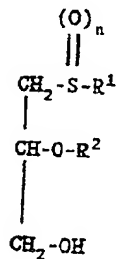
n 0, 1 oder 2 bedeutet und

m 0 bzw. für 1 bis 3 steht,

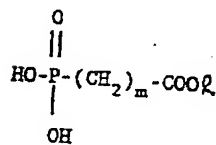
deren Tautomere, optischen Isomere, Racemate und deren physiologisch verträgliche Salze anorganischer und organischer Basen.

2. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, in dem man

i) eine Verbindung der allgemeinen Formel II,



(II) ,

in der R¹, R² und n die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III,

(III) ,

in der m die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzt und R einen C₁—C₆-Alkylrest darstellt, in Gegenwart von einem gegebenenfalls substituierten Arylsulfonsäurechlorid in einer organischen Base, bzw. in Gegenwart der Base in einem inerten organischen Lösungsmittel umsetzt und anschließend den Carbonsäureester durch alkalische Verseifung in ein Derivat der Formel bzw. dessen physiologisch verträgliches Salz überführt;

oder

ii) ein gemischtes Anhydrid aus einer Verbindung der Formel III und einem Alkyl- oder Arylsulfonsäurechlorid herstellt und in Gegenwart einer Base in einem inerten organischen Lösungsmittel bzw. direkt in der Base mit einem Alkohol der Formel II zur Reaktion bringt und anschließend den Carbonsäureester alkalisch verseift; oder

iii) eine Phosphonocarbonsäure der Formel III, in der R gleich Wasserstoff ist, mit einem Alkohol der Formel II in Gegenwart einer Base und eines gegebenenfalls substituierten Arylsulfonsäurechlorids umsetzt und nach Bedarf in ein physiologisch verträgliches Salz überführt; oder

iv) ein gemischtes Anhydrid aus einer Verbindung der Formel III, in der R gleich Wasserstoff ist, und einem Alkyl- oder Arylsulfonsäurechlorid in Gegenwart einer Base, evtl. in einem inerten organischen Lösungsmittel, mit einem Alkohol der Formel II zur Reaktion bringt und das Konjugat gegebenenfalls in ein physiologisch verträgliches Salz überführt; oder

v) eine Verbindung der Formel III, in der R einen C_1-C_6 -Alkylrest darstellt, mit Oxalylchlorid, in das entsprechende Phosphonsäuredichlorid überführt, das anschließend mit einem Alkohol der Formel II in Gegenwart einer Base im Molverhältnis 1 : 1 umgesetzt wird. Das als Zwischenprodukt entstehende Phosphonsäure-mono-chlorid wird zum Halbester verseift und der Carbonsäureester durch alkalische Verseifung in ein Derivat der Formel I bzw. dessen physiologisch verträgliches Salz überführt.

3. Arzneimittel enthaltend mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1 neben üblichen pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoffen.

4. Verwendung mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, Neoplasmen, entzündlicher, viraler oder retroviraler Erkrankungen.